

PCT/JF98/00909

23.03.98

6

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 25 MAY 1998

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1997年12月16日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9年特許願第346737号

出 願 人

Applicant(s):

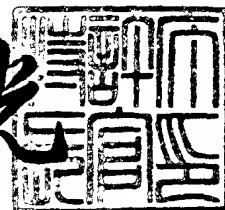
大塚製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 5月 1日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平10-3032691

【書類名】 特許願

【整理番号】 2A57JP

【提出日】 平成 9年12月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 37/00

【発明の名称】 免疫寛容誘導剤

【請求項の数】 1

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市城東区天王田4丁目29-401号

【氏名】 金 鉄南

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府枚方市招提南町1-47-1-105

【氏名】 杉浦 喜久弥

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市都島区友浜町1丁目5-8-1004

【氏名】 池原 進

【特許出願人】

【識別番号】 000206956

【住所又は居所】 東京都千代田区神田司町2丁目9番地

【氏名又は名称】 大塚製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【選任した代理人】

【識別番号】 100109438

【弁理士】

【氏名又は名称】 大月 伸介

【選任した代理人】

【識別番号】 100109427

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 活人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9708032

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫寛容誘導剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫寛容の誘導に放射線照射と共に用いられる医薬であって、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原を有効成分とする単回投与用医薬形態からなる免疫寛容誘導剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臓器移植、より詳しくは移植された臓器の維持を可能とする免疫寛容を達成できる免疫寛容誘導剤に関する。

【0002】

【従来技術】

免疫寛容の人為的な誘導（免疫寛容の成立）は、臓器移植における最終目標として注目され、種々の研究成果が報告されている。

【0003】

免疫寛容を導入、維持する方法のひとつとしてキメリズムの確立が知られている。本発明者等は先に、マウスを用いて、骨髓細胞（特に造血幹細胞）を門脈内又は静脈内投与すると肝臓に捕捉され、キメリズムが成立し、免疫学的寛容が誘導されることを報告した〔Eur. J. Immunol., 24: 1558 (1994)〕。

【0004】

更に、本発明者等は、寛容原（tolerogen）の利用により上記所望の免疫寛容を達成でき、もって臓器移植における移植臓器の良好な維持を可能とする免疫寛容誘導剤にかかる発明を先に完成し特許出願した〔平成9年特許願第155015号〕。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、より侵襲の少ない処置で確実にキメリズムを導入し、免疫寛容状態を長期間維持できる技術を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、免疫寛容の誘導に放射線照射と共に用いられる医薬であって、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原を有効成分とする単回投与用医薬形態からなる免疫寛容誘導剤が提供される。

【0007】

本発明の免疫寛容誘導剤（本発明医薬）の利用によれば、前述した目的に合致する所望の免疫寛容を達成でき、臓器移植における移植臓器の良好な維持が可能となる。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明医薬における有効成分である、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原としては、例えば移植臓器ドナー（マウスではドナーと同系）由来のものを挙げることができ、これは、造血幹細胞や造血前駆細胞を含む骨髓細胞、末梢血細胞又はそれらの混合物であることができる。

【0009】

これら寛容原の分離及び単離は、公知の方法に従うことができ、例えば山本等の文献[Blood, Vol 88, pp 445-454 (1996)]や「細胞免疫実験操作法」[Mishell B. B., Shigi S. M. 編、今井勝行、川口進、原田孝之供訳、理工学社、3-12頁、1982年]等に記述されている方法等が参照される。

【0010】

移植臓器ドナー（ヒト）からの寛容原としては、骨髓細胞、臍帯血幹細胞及びG-CSF等のサイトカインで骨髓より動員される造血幹細胞を含む末梢血細胞等を具体例として例示できる。

【0011】

上記ヒトにおける寛容原の取得は当業者に周知であり、例えば、骨髓移植における場合に準ずることができる。

【0012】

本発明医薬において、かかる有効成分は、単回投与用医薬形態に調製されるこ

とを必須として、通常この種の細胞成分からなる各種医薬製剤と同様にして調製することができる。かかる医薬製剤としては、各種の形態が所望により選択できる。その代表的なものとしては、例えば注射剤を例示できる。これらの医薬製剤の調製に用いられる、薬学的に許容される各種の担体も、この分野で従来よりよく知られているものを広く利用することができる。医薬製剤の調製も常法に従うことができる。また、これら製剤の調製に際しては、現在汎用されている各種の輸液用製剤の利用も可能である。

【0013】

尚、本発明において上記医薬製剤は、移植に際して移植臓器ドナーより用時調製することもできる。

【0014】

本発明医薬を利用する免疫寛容の誘導は、放射線照射と共に本発明医薬を門脈内又は静脈内に単回投与することにより実施される。

【0015】

上記放射線照射は、移植が行われるレシピエントに所定量の放射線を照射することにより行なわれ、これは常法に従うことができる。より具体的には、全身照射(TBI)による1回の放射線照射として、6.5 Gy以上で且つ致死量に満たない量(sublethal)、好ましくは7.0 Gy程度を採用して実施される。かかる放射線量は、レシピエントの骨髓細胞が回復する放射線量としても特徴付けられる。

【0016】

本発明に係わる免疫寛容の誘導において、本発明医薬は、上記放射線照射と共に用いられることを必須とする。これは、通常、放射線照射後約24時間以内に単回投与される。上記単回投与とは、門脈内又は静脈内への1回の投与を意味する。本発明によれば、かかるレシピエントへの侵襲の少ない処置によって本発明所望の効果が奏される利点がある。

【0017】

本発明医薬の投与量は、通常的主要組織適合遺伝子複合体(MHC)不適合の骨髓移植(マウスでは致死量の放射線照射後)において、宿主の免疫系を再構築

するのに十分な量（マウスでは 3×10^7 個）を目安とすることができる。

【0018】

上記マウスにおける投与量を目安として、また通常の骨髄移植におけるそれらに準じて、本発明医薬の投与量は適宜決定できる。その具体的量としては、例えば、骨髄細胞として 3×10^8 個/kg程度或はそれ以上を例示することができる。

【0019】

かくして、放射線照射との併用による本発明医薬の投与により、所望の免疫寛容が誘導され、移植臓器の良好な維持が可能となる。

【0020】

尚、本発明にかかる処置によって、所望の免疫寛容が誘導され、移植臓器の良好な維持が可能となる現象は、移植臓器の移植術施行の時期とは関係しない。従って、当該移植術は、本発明処置と平行して或いは本発明処置による免疫寛容が達成された後に、いずれも良好に行うことができる。

【0021】

また、本発明にかかる免疫寛容の誘導に際しては、本発明の効果が害されない限りにおいて、通常この種の処置に際して利用される各種の医療処置や他の医薬製剤の併用をすることができる。その例としては、例えばシクロスポリンA、FK506等の各種の免疫抑制剤等を例示できる。それらの用量、用法等は既知（市販品）のそれらに従うことができる。

【0022】

【実施例】

以下、本発明を更に詳しく説明するため試験例及び製剤例を挙げる。

【0023】

【試験例1】

免疫寛容誘導は、以下のとおり、異系ドナーの骨髄細胞の門脈内又は静脈内注射によって行い、免疫寛容の成立は、拒絶反応を最も受けやすい臓器である皮膚（ドナーと同系）の移植による生着の程度を観察してその指標とした。

【0024】

(1) 骨髓細胞浮遊液の調製

ドナーマウスより大腿骨及び脛骨を取り外し、それぞれ、膝関節側よりシリンジ (2.5ml, Code No. SS-02S, Terumo Co., Ltd.) につけた22ゲージ針 (Code No. NN-2225R, Terumo Co., Ltd.) を刺入し、シリンジ中のRPMI 1640溶液にて骨髓細胞を滅菌シャーレ (90×15mm, Iwaki Clinical Test Ware) へ押し流した後、RPMI 1640溶液中に懸濁させ、得られる骨髓細胞をRPMI 1640溶液にて1回洗浄後、同溶液中に浮遊させて所望の骨髓細胞浮遊液 ($1 \times 10^8/\text{ml}$ 濃度) を調製した。

【0025】

(2) 放射線照射

レシピエントマウスの放射線照射は、 ^{137}Cs を線源としたガンマセル40エグザクター (Nordion International Inc.社製) を用いた1回の全身照射により行った。

【0026】

(3) 門脈内注射

レシピエントマウスをペントバルビタール (Pitman-Moor Inc.; 37.5mg/kg体重i.p.) 麻酔下にて剃毛、消毒し、腹部正中切開を行った後、腸間膜を露出させ、1ml-ツベルクリン用シリンジにつけた27ゲージ針 (Terumo Co., Ltd.) を腸間膜脂肪組織を経て刺入させ、前記で調製したドナーマウスの脾細胞又は骨髓細胞の 3×10^7 個 (浮遊液 0.2ml) を門脈内に注射投与した。

【0027】

(4) 静脈内注射

前記で得たドナーマウスの骨髓細胞浮遊液を、 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 濃度に調整し、その 3×10^7 個 (0.3ml) をレシピエントマウスの尾静脈より注射投与した。

【0028】

(5) 皮膚移植

皮膚移植片の調製及び移植方法は、文献記載の方法 [Mayumi et al., Jpn. J. Surg., 18, 548-557 (1988)] を参照して、以下の通り行った。

【0029】

即ち、ドナーマウスをエチルエーテル (Nacalai Tesque Inc.) 麻酔下で屠殺し、除毛剤 (Feather Hair Remover, Feather Safty Razor Co., Ltd.) にて全身の体毛を除去し、70%アルコール溶液にて除菌した後、皮膚全層を剥離採取した。ピンセット (先曲がり先細無鉤) 及び滅菌綿棒を用いて可及的に皮下脂肪組織を剥離した後、皮膚片 (1.2×1.5cm四方) に細切し、頭側の一边にマーカースとして1mmの切開を加え、冷却した無菌のリン酸緩衝食塩水 (Dulbecco's PBS (-), Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) 中に浮遊させた。

【0030】

レシピエントマウスをペントバルビタール (37.5mg/kg体重i.p.) で麻酔した後、右背側部を手指による抜毛及び前記除毛剤により除毛 (3.0×3.5cm四方) し、70%アルコール溶液にて除菌して移植のための術野を作製した。

【0031】

剥離面に上記調製したドナーの皮膚片をマーカースを尾部に向けて設置し、6-0針付きナイロン縫合糸 (Ethilon; Ethicon Inc.) にて8針 (4辺の中央と4角) を縫合した。皮膚移植面を硫酸フラジオマイシン軟膏付きガーゼ (2.0×2.5cm四方, Sofratulle; Japan Roussel Co., Ltd.) で覆い、更に粘着性伸縮包帯 (Elatex; Alcare Co., Ltd.) で巻いた。

【0032】

(6) 寛容誘導

ドナーとして、(BALB/c×DBA2) F1マウス (H-2K^d) (7-8週齢、19-20g、日本SLC) を、レシピエントとしてB6マウス (H-2K^b) (10-13週齢、20-23g、日本SLC) を用い、レシピエントへの放射線照射1日後に、ドナー骨髓細胞を門脈内又は静脈内に投与した。皮膚移植は、骨髓細胞の門脈内又は静脈内投与と同日に実施し、皮膚移植生着の有無は、移植術後3週間目より観察した。

【0033】

(7) 結果

結果を図1に示す。

【0034】

図1において、縦軸は、皮膚生着率 (Survival rate) (%) を、横軸は、移植術後の経過週数 (Weeks after treatment) を示し、図中の「Group I (---)」は、放射線の6.5 Gy照射及び骨髓細胞の門脈内投与群 (n=3) (Group I:6.5Gy+pv(n:3)と表示) における結果を、同「Group II (---)」は、放射線の7.0 Gy照射及び骨髓細胞の門脈内投与 (n=9) 又は同静脈内投与群 (n=5) (Group II:7Gy+pv(n:9) or iv(n:5)と表示) における結果を、同「Group I II (---)」は、放射線の6.5 Gy照射及び骨髓細胞の静脈内投与群 (n=7) (Group III:6.5Gy+iv(n:7)と表示) における結果を、同「Group IV (実線)」は、放射線の6.0 Gy照射及び骨髓細胞の門脈内投与 (n=5) 又は同静脈内投与群 (n=3) (Group IV:6.0Gy+pv(n:5) or iv(n:3)と表示) における結果をそれぞれ示す。

【0035】

(8) 結果の説明

B6マウスに7.0 Gy、6.5 Gy又は6.0 GyのTBIを行ない、約24時間後、(BALB/c×DBA/2) F1マウス (CDF1) の骨髓細胞を門脈内 (pv) 又は静脈内 (iv) に投与し、同日に皮膚移植を実施した。結果は、図1に示すように、7 Gy照射したレシピエントマウスにおいては、門脈内及び静脈内投与群ともに、移植後23週 (167日) 目の時点でドナー (CDF1) の皮膚移植片の生着率が100%である (pv投与群で9匹中9匹、iv投与群で5匹中5匹生着)。それに対して、6.0 Gy照射したレシピエントマウスにおいては、門脈内及び静脈内投与群ともに、皮膚移植片は移植後3週以内に全てのレシピエントマウスで拒絶された (pv投与群で5匹中5匹、iv投与群で3匹中3匹拒絶)。6.5 Gy照射したレシピエントマウスにおいては、移植後3週の時点で、静脈内投与群で7匹中1匹で皮膚移植片が拒絶されたが、門脈内投与群では13週の時点で3匹中3匹のレシピエントマウスで皮膚移植片が生着している。

【0036】

(9) 考察

6.5 Gyで門脈内投与群の方が生着がわずかに高かった。このことは、肝臓

内にドナーの造血幹細胞が、より効率的に肝臓内にトラップされるため、レシピエントマウス内の放射線耐性の免疫担当細胞による拒絶反応から免れやすいためであると考えられる。

【0037】

【製剤例1】

骨髓細胞を生理食塩水に懸濁して、 1×10^8 細胞/mlの細胞浮遊液を調製する。門脈投与用として、ヒトの場合、通常 3×10^8 細胞/kg以上の骨髓細胞（少量のT細胞が混入していても可）投与量で投与されるのが好ましく、少なくとも当該投与量を含む単回投与用形態である注射剤を調製する。

【図面の簡単な説明】

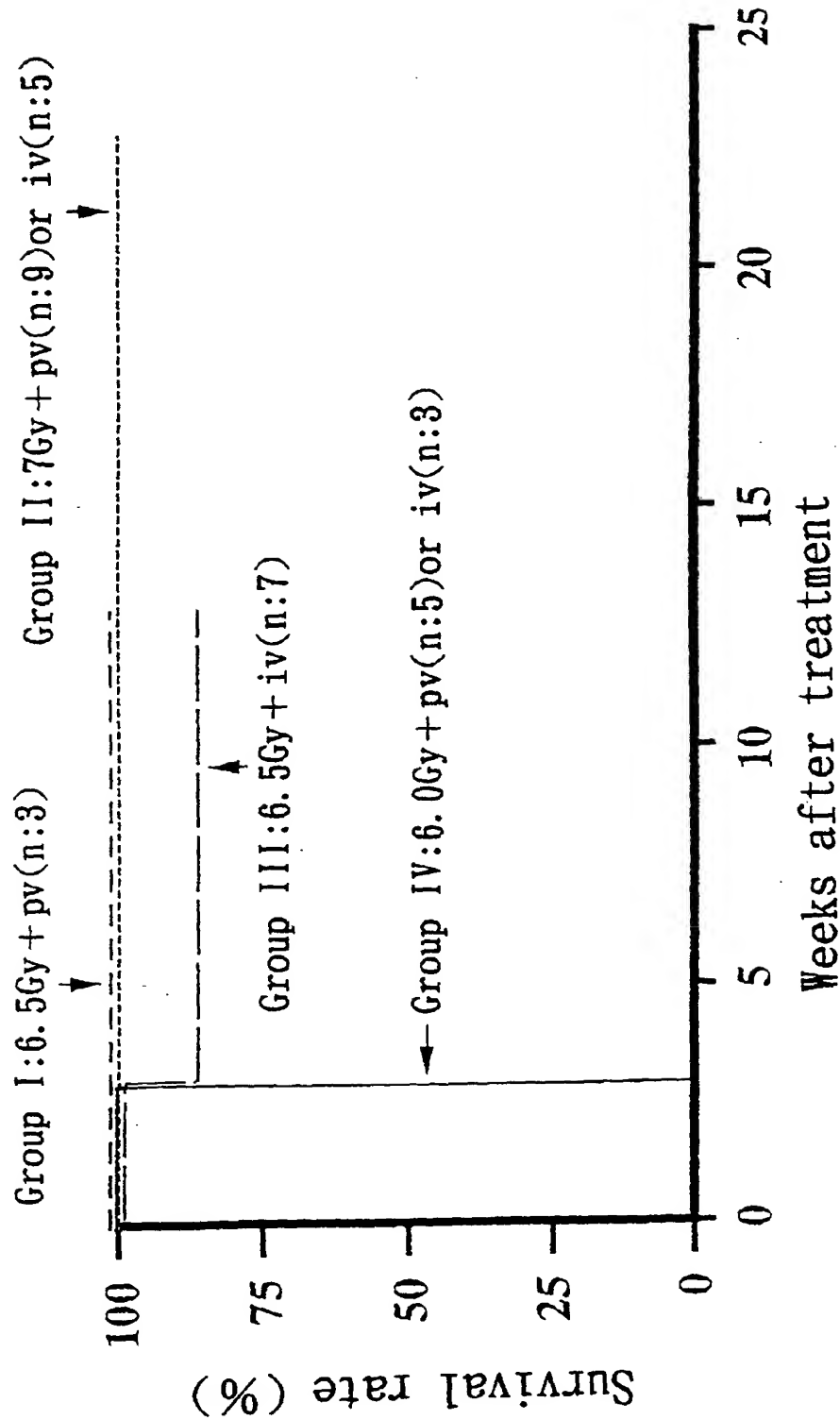
【図1】

試験例1における皮膚移植生着の結果を示す図面である。

【書類名】

図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 侵襲の少ない処置により免疫寛容を誘導でき移植臓器の維持を可能とする新しい免疫寛容誘導剤を提供。

【解決手段】 放射線照射と共に免疫寛容の誘導に用いられる医薬であって、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原を有効成分とする単回投与用医薬形態からなる免疫寛容誘導剤。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000206956
【住所又は居所】 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
【氏名又は名称】 大塚製薬株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100065215
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 三枝 英二
【選任した代理人】
【識別番号】 100076510
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 掛樋 悠路
【選任した代理人】
【識別番号】 100086427
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 小原 健志
【選任した代理人】
【識別番号】 100090066
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 中川 博司
【選任した代理人】
【識別番号】 100094101
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 舘 泰光
【選任した代理人】
【識別番号】 100099988
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 斎藤 健治
【選任した代理人】

【識別番号】 100105821
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 藤井 淳
【選任した代理人】
【識別番号】 100099911
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 関 仁士
【選任した代理人】
【識別番号】 100108084
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 中野 睦子
【選任した代理人】
【識別番号】 100109438
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 大月 伸介
【選任した代理人】
【識別番号】 100109427
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 鈴木 活人

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000206956]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田司町2丁目9番地
氏 名	大塚製薬株式会社

